

0-732852-1



На правах рукописи

ИЛЛАРИОНОВА ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**МИКРОМИЦЕТЫ РОДА *TRICHODERMA* КАК СРЕДСТВО
БИОЗАЩИТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ КАПУСТЫ
В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН**

03.00.07 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ - 2002

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета
Казанского государственного университета им. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор С.Ю. Егоров

Консультант: кандидат биологических наук,
доцент, Н.Г. Захарова

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Ишмухаметова Д.Г.

доктор биологических наук,
профессор Мелентьев А.И.

Ведущая организация: институт микробиологии РАН, г.Москва

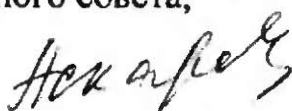
Защита диссертации состоится 19 декабря 2002 г. в 14.30 часов
на заседании диссертационного Совета Д 212.081.08. при Казанском
государственном университете им. Ульянова-Ленина
по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан _____ 2002 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



А.Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Современная стратегия защиты растений осуществляется, на основе внедрения устойчивых сортов, использования агротехнических мероприятий, химических и биологических средств защиты, т.е. комплексно. Вместе с тем некоторые агротехнические приемы такие как, минимальная система обработки почвы с целью сохранения влаги, предотвращение эрозии и дефляции, создают благоприятные условия на посевах и посадках для развития возбудителей заболеваний растений. Не улучшает фитосанитарную ситуацию в сельском хозяйстве и введение новых высокоурожайных и высококачественных сортов растений. Это лишь на время снимает остроту проблемы, так как перманентная изменчивость паразита по вирулентности приводит к формированию новых популяций возбудителей заболеваний, способных поражать вновь введенные в производства сорта. Широкое применение в растениеводстве интенсивной химизации также вызывает серьезные проблемы: накопление в почвах персистентных остатков, непредсказуемое действие пестицидов на не целевые объекты, нарушение биоценотического равновесия в популяциях микроорганизмов, обострение фитопатологической обстановки, рост числа устойчивых к химическому воздействию фитопатогенных микроорганизмов, снижение качества сырья, фуражной и пищевой продукции и т.п. (Чулкина В.А., Торопова Е.Ю., 1997; Романенко Н.Д., 1999; Рябчинская Т.А., 2000).

В связи со сказанным, во многих регионах мира, а также и в Татарстане весьма актуальной является проблема разработки средств защиты растений.

В настоящее время в борьбе с возбудителями заболеваний растений большое значение начинают приобретать биологические средства защиты, в основе которых лежат природные, естественные явления сверхпаразитизма и антибиоза между сапротрофной, паразитной и фитопатогенной микробиотой. Использование этих регуляторных механизмов в настоящее время направлено с одной стороны на создание благоприятных условий для воспроизводства местных микроорганизмов-антагонистов, с другой – на уменьшение численности возбудителей заболеваний путем интродукции антагонистов-супрессоров. Однако реализация стратегии оперативного сдерживания фитопатогенных микроорганизмов возможна лишь при наличии эффективных агентов биоконтроля, среди которых в открытых и полужакрытых агроэкосистемах наиболее часто используются микромицеты-антагонисты рода *Trichoderma* (Чулкина В.А., Торопова Е.Ю., 2001; Коломбет Л.В. и др., 2001).

Вместе с тем в ряде случаев применение активных антагонистов не дает положительных результатов. Причины этого явления могут быть различны: незнание особенностей структуры комплекса микромицетов, в экологотрофической нише, в которую вводится антагонист, его низкая

конкурентоспособность и приживаемость в эконисше, неспособность к быстрому вытеснению из нее фитопатогенных микроорганизмов и т.п.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось создание на основе микромицетов рода *Trichoderma* эффективных биопрепаратов для защиты капусты с учетом фитосанитарного состояния ее семян и посевов в Республике Татарстан.

В соответствии с целью исследования в работе были поставлены следующие задачи:

1. Оценить фитосанитарное состояние семян, рассады и посевов различных сортов белокочанной капусты.

2. Выделить микромицеты рода *Trichoderma* из различных экологических ниш (семена, ризосфера растений, тепличный грунт, почва полей), определить уровень конкурентоспособности и антагонистической активности различных штаммов по отношению к возбудителям заболеваний капусты.

3. Оценить действие *Trichoderma harzianum* на показатели биологической активности почвы и ее плодородие (активность почвенных ферментов, "дыхание" и азотфиксирующая способность тепличного грунта).

4. Разработать систему мероприятий по практическому применению триходермы для защиты капусты от возбудителей различных заболеваний.

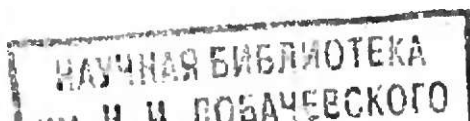
Научная новизна работы. Впервые в Татарстане проанализировано фитосанитарное состояние семенного фонда и посевов белокочанной капусты. Показано, что поражение капусты возбудителями заболеваний наблюдается практически на всех этапах ее роста и развития.

Впервые на основе оценки фитопатологической ситуации в Республике Татарстан предложена система мероприятий по защите белокочанной капусты микромицетами рода *Trichoderma*.

Из 42 выделенных штаммов *Trichoderma*, отобраны штаммы *T.harzianum* ТА и *T.harzianum* Т26, обладающие высокой конкурентоспособностью и антагонистической активностью к широкому спектру фитопатогенных микроорганизмов и, особенно, к возбудителям заболеваний капусты.

Впервые использован биотехнологический подход к применению биопрепаратов с учетом структуры микробного населения и меняющегося температурного режима экологической ниши.

Практическое значение работы. Выделенные нами штаммы *T.harzianum* ТА и *T.harzianum* Т26 могут быть использованы при получении биопрепаратов для защиты белокочанной капусты. Отработана схема применения и нормы расхода биопрепаратов. Испытания проведены в совхозе «Казанский Тепличный» Республики Татарстан.



Предложенные микромицеты по своему защитному действию эффективнее ряда, широко применяемых химических препаратов, а также обладают ростстимулирующим действием на растения.

В диссертации имеется акт производственного испытания, подтверждающий эффективность использования микромицетов рода *Trichoderma*.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на конференциях: «Интродукция микроорганизмов в окружающую среду» (Москва, 1994), «Молодых ученых» (Саратов, 1997), «Актуальные вопросы мониторинга экосистем антропогенно-нарушенных территорий» (Ульяновск, 2001), «Ферменты микроорганизмов» (Казань, 2001), «Почва, жизнь, благосостояние» (Пенза, 2001), на итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (1996, 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них 4 статьи, 4 тезиса и 1 учебно-методическая разработка.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 164 страницах; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 21 таблицу, 10 рисунков. Список литературы содержит 195 отечественных и 131 зарубежных авторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были микроорганизмы рода *Trichoderma*, выделенные нами из различных мест обитания: *T. viride* 22, *T. viride* 28, *T. viride* 17, *T. viride* 21, *T. koningii* 29, *T. harzianum* TA и *T. harzianum* T26.

В качестве тест-объектов при определении антагонистической активности выделенных штаммов триходермы были использованы возбудители заболеваний сельскохозяйственных растений, полученные из Всесоюзной коллекции микроорганизмов (ВКМ, г. Москва), ВНИИ защиты растений (ВНИИЗР, г. Санкт-Петербург) и фитопатогенные микроорганизмы, выделенные нами с семян, органов пораженных растений и растительных остатков различных сортов капусты (Основные методы фитопатологических исследований, 1974).

Микромицеты рода *Trichoderma* выделяли из тепличного грунта, почвы различных полей свободных от растений, с семян, а также прикорневой зоны не пораженных растений капусты на среде Чапека и картофельно-глюкозном агаре (Методы..., 1991).

Значимость вида микромицета (типичность и положение в структуре доминирования) оценивали по критерию частоты встречаемости микромицета в агрофитоценозе (Мирчинк А. И др., 1992).

Определение конкурентоспособности изолятов *Trichoderma* и их антагонистической активности по отношению к фитопатогенным микромицетам проводили методом двойных встречных культур (Штейнберг и др., 1991).

Для описания типов взаимоотношений между исследуемыми организмами использовали шкалу Джексона и Карла (Сейкетов, 1982).

При получении биопрепарата на основе штаммов *T. harzianum* ТА и *T. harzianum* Т26 использовали спорный материал, адсорбированный на субстрате (шелуха) из расчета 10^9 спор/г субстрата. (Алимова Ф.К. и др., 1994).

Учет и выделение возбудителей заболеваний капусты осуществляли обследованием производственных посевов в течение двух вегетационных сезонов 1997- 1998 гг. в различные фазы вегетации растений. Исследовали частоту встречаемости возбудителей заболеваний капусты на полях и в теплицах совхозов РТ: "Нокса", "Овощевод" Зеленодольского района, "Нарманский" Лаишевского района. Всего было обследовано 15 полей. Учет болезней растений в период вегетации (в защищенном грунте) проводили по методу, описанному Д.М. Дементевой (1986).

Бактериологические исследования проводили по методу Матвеевой Е.В. и Одинцовой М.А. (1987).

Количественный учет микроорганизмов проводили на семенах капусты следующих сортов: Трансфер F1, Июньская, Золотой гектар 1432, Слава 1305, Надежда, Подарок 2500, Московская поздняя, Грибовская 147, Амагер, Харьковская зимняя.

Пораженность семян грибами определяли по методу Пуйлене И.К., (1988). Внутреннюю микрофлору семян выявляли по методу Наумовой Н.А. (1970).

Бактериальную инфекцию на семенах выявляли по Коробко А.П. (1997).

Фунгистатическое действие почвы определяли по времени и уровню прорастания спор *T. harzianum* ТА и Т26 (Методы..., 1991).

Фитотоксическую активность почвы при внесении триходермы исследовали по Бабьевой И.П. и Зеновой Г.М. (1990).

Определение численности и биомассы микроорганизмов в почве проводили методом прямого счета в люминисцентном микроскопе по Звягинцеву и Кожевину (Головченко А.В. и др., 1995).

Протеолитическую активность почвы определяли методом Галстяна и Арутюняна (Колешко О.И., 1988).

Уреазную активность почвы регистрировали методом Галстяна (Колешко О.И., 1988).

Каталазную активность почвы измеряли титрометрическим методом Баха и Опарина в модификации О.И. Колешко (1988).

Определение интенсивности разложения целлюлозы проводили аппликационным методом (Методы..., 1991).

Активность азотфиксации в почве определяли «ацетиленовым» методом (Гарусов А.В. и др., 1998).

Интенсивность дыхания измеряли на газовом хроматографе (Ананьева Н.Д. и др., 1997).

Статистическая обработка результатов. Анализ полученных данных осуществляли с использованием компьютеризованного теста Стьюдента, принимая критерий $P < 0,05$ достаточным для достоверной разницы в результатах, а также методом дисперсионного анализа (Доспехов, 1987).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 1. ФИТОСАНИТАРНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕМЕННОГО ФОНДА И ПОСЕВОВ БЕЛОКОЧАННОЙ КАПУСТЫ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

1.1. Фитоэкспертиза семян различных сортов капусты

Обследование семян и посадок различных сортов белокочанной капусты показало, что среди многочисленных болезней капусты наиболее распространенными и вредоносными являются: черная ножка (*Olpidium brassicae*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium debaryanum*, *P. aphanidermatum*, *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea*), фузариоз (*Fusarium oxysporum*), черная пятнистость (*Alternaria brassicae* и *A. brassicicola*), фомоз (*Phoma lingam*), ложная мучнистая росса (*Peronospora brassicae*), сосудистый (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) и слизистый бактериозы (*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*).

Как показала фитоэкспертиза (табл. 1), доля семян, пораженных возбудителями серой и белой гнили, незначительна (от 1,0 до 5,5 %), а доля семян, пораженных возбудителями трахеомикозного увядания растений (фузариоз), составила от 3,2 до 10,0 %. Зараженность семян возбудителями черной пятнистости находилась в пределах 5,2-15,1 %, фомоза - 4,2-8,3 %, в то время как, согласно предложенному фитосанитарному регламенту, зараженность семенного материала возбудителями заболеваний, не должна превышать 5% (Чулкина В.А., 1991; Чулкина В.А., 2001).

Большой ущерб семенному фонду наносят сапротрофные плесневые грибы из родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, угнетающие прорастание семян и, вызывающие загнивание проростков. Нами обнаружено, что заражение семян плесневыми грибами было в пределах от 2,1 до 28,2 %, в зависимости от рода микромицета и сорта капусты. На семенах капусты были выявлены также возбудители бактериозов, вызываемые микроорганизмами родов *Erwinia* и *Xanthomonas*. Наименее пораженными микроорганизмами являлись семена капусты сортов: Слава 1305, Подарок 2500, Трансфер F1, Московская поздняя.

Таблица 1

Фитоэкспертиза семян различных сортов капусты

Пораженность семян капусты микроорганизмами	Показатель пораженности семян, %								
	Трансфер F1	Июньская	Грибовская	Золотой гектар	Слава	Надежда	Харьковска я зимняя	Подарок	Московская поздняя
<u>фитопатогенами:</u>									
фузариоз (<i>Fusarium oxysporum</i>)	3,2	10,0	8,1	8,2	4,2	7,2	4,9	3,5	4,3
черная пятнистость (<i>Alternaria brassicae</i>)	9,3	11,8	14,8	12,7	8,9	15,1	14,2	5,2	10,2
фомоз (<i>Phoma lingam</i>)	4,5	7,5	7,6	6,1	5,9	8,3	8,0	4,2	5,2
белая гниль (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	3,2	5,5	5,2	4,1	4,3	4,9	4,0	4,1	4,2
серая гниль (<i>Botrytis cinerea</i>)	1,0	2,0	1,8	2,5	1,3	1,7	3,3	1,2	1,5
<u>плесневыми грибами:</u>									
аспергиллез (<i>Aspergillus spp.</i>)	16,8	25,0	24,4	27,8	19,2	28,2	24,3	15,1	14,5
пенициллез (<i>Penicillium spp.</i>)	11,3	19,7	19,1	2,1	12,4	20,0	18,4	12,1	13,3
оливковая плесень (<i>Cladosporium spp.</i>)	4,2	9,0	9,1	8,1	7,2	10,2	7,5	5,5	6,8
серая плесень (<i>Mucor spp.</i>)	10,1	14,4	11,9	15,2	13,4	17,0	15,4	12,3	11,2
<u>Бактериозы:</u>									
слизистый (<i>Erwinia carotovora</i>)	9,0	12,3	13,1	14,3	11,1	18,0	15,2	8,2	10,3
сосудистый (<i>Xanthomonas campestris</i>)	18,0	47,0	38,4	27,3	25,1	21,7	34,2	17,1	17,6

1.2. Оценка структуры комплекса микроскопических грибов на семенах капусты

Определение структуры комплекса микроскопических грибов была осуществлена на основе частоты встречаемости видов: типично доминантные (> 60%), типично частые (>30%), типично редкие (>10%) и случайные микромицеты (<10%) (Зенова Г.М., Кураков А.В. 1988).

Сравнение структуры комплексов микромицетов, заселяющих поверхностные и внутренние ткани семян капусты, выявило различие между ними. Лидирующее положение на поверхности семян среди сапротрофных микромицетов занимали грибы из родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Во внутренних

тканях семян аспергиллы и пенициллы были представлены меньшим числом видов с низкой частотой встречаемости (от 5 до 25 %).

В числе микромицетов, формирующих поверхностную микрофлору семян капусты сортов Слава 1305, Подарок 2500, Московская поздняя и Трансфер F1 были обнаружены представители родов *Trichoderma* и *Gliocladium*, известные как антагонисты многих возбудителей заболеваний растений. По частоте встречаемости эти микромицеты можно отнести в группы типично частые и типично редкие в зависимости от их вида.

1.3. Исследование фитосанитарного состояния рассады и посевов белокочанной капусты

Обследование посадок различных сортов белокочанной капусты в течение трех лет (1997-1999) позволило составить представление о видовом разнообразии фитопатогенных микромицетов, циркулирующих в Татарстане (табл. 2).

Таблица 2

Фитосанитарное состояние посадок белокочанной капусты
в различных районах Республики Татарстан

Болезни капусты	Возбудители заболеваний	Районы: Высокогорский, Зеленодольский, Лаишевский	
		Потери рассады, %	Потери на посадках, %
Черная ножка	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium debaryanum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Botrytis</i> sp.	20-40, в отдельных случаях до 80	не обнаружено
Фузариозное увядание	<i>Fusarium oxysporum</i>	14-24, в отдельных случаях до 30	16-21
Ризоктониоз	<i>Rhizoctonia solani</i>	не обнаружено	12-18
Белая гниль	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	в почвогрунте 10-19	17-35
Серая гниль	<i>Botrytis cinerea</i>	не обнаружено	15-32
Фомоз	<i>Phoma lingam</i>	не обнаружено	15-22
Ложная мучнистая роса	<i>Peronospora brassicae</i>	15-28	12-18
Альтернариоз	<i>Alternaria brassicae</i>	в почвогрунте до 10	18-27
Сосудистый бактериоз	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	не обнаружено	до 25, на отдельных полях 50-60
Слизистый бактериоз	<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	не обнаружено	до 20, на отдельных полях до 40

Изучение видового разнообразия возбудителей черной ножки рассады показало, что в патологическом процессе участвуют различные фитопатогенные грибы с преобладанием *Rhizoctonia solani* и *Pythium debaryanum* (частота

встречаемости - 100%). Из пораженных тканей, корневой шейки рассады выделялись также, *Fusarium* sp. и *Botrytis cinerea*. Потери рассады (30 дневной) от черной ножки в теплицах и рассадниках различных хозяйств достигали 20-40%, а в отдельных теплицах - 80%. В этот же период исследования в ризосфере и, особенно, в филлосфере различных сортов капусты постоянно регистрировались возбудители белой (*Sclerotinia sclerotiorum*) и серой (*Botrytis cinerea*) гнилей. Пораженность посадок капусты сосудистым и слизистым бактериозами составляла от 20 до 25 % соответственно. На некоторых участках пораженность растений достигала 40-60% (табл. 2).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать заключение, что фитопатологическая ситуация на полях с посевами белокочанной капусты в Татарстане является не благополучной.

1.4. Динамика фитопатогенных бактерий в ризосфере и филлосфере капусты

Исследования ризосферы различных сортов белокочанной капусты показали широкое распространение *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* - возбудителей слизистого бактериоза (табл. 3).

Таблица 3

Численность *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* в ризосфере различных сортов белокочанной капусты

Место взятия проб	Сорт	Год обсле- дования	Количество клеток, 10^4 / г			
			июнь	июль	август	сентябрь
Совхоз «Овощевод»	Грибовская 147	1997	1,4	31	271	*
		1998	2,3	42	312	
	Золотой гектар 1432	1997	0,7	13	101	*
		1998	0,9	18	129	
	Слава 1305	1997	2,6	59	416	*
		1998	5,4	97	782	
	Подарок	1997	0,9	16	102	75
		1998	1,1	21	158	111
	Московская поздняя	1997	1,0	21	111	63
		1998	1,5	27	167	112
Совхоз «Юкса»	Золотой гектар 1432	1997	0,5	11	112	*
		1998	0,8	13	102	
	Трансфер F1	1997	0,65	3,5	*	*
		1998	0,9	7,2		
Совхоз «Нарма нский»	Харьковская зимняя	1997	1,4	21	113	118
		1998	2,1	32	326	275
	Амагер	1997	1,5	23	219	163
		1998	2,3	51	401	285

* - не обследовано в связи с тем, что урожай был собран

Наибольшее число этих бактерий выявлено в ризосфере капусты сортов: Грибовская 147, Слава 1305, Харьковская, Амагер.

Наращение количества бактерий в почве ризосферы отмечено с июня месяца. В процессе вегетации растений численность популяции возбудителя возрастала и достигала максимума в августе, с тенденцией к снижению осенью.

Установлено, что возбудители слизистого бактериоза могут заселять и филлосферу капусты. Пик численности бактерий на листовой поверхности приходился на начало августа в зависимости от сорта капусты.

Таким образом, фитосанитарная ситуация, сложившаяся в Республике Татарстан на посевах капусты, диктует необходимость разработки эффективных средств защиты семенного фонда и посадочного материала.

ГЛАВА 2. СКРИНИНГ ШТАММОВ *TRICHODERMA* АКТИВНЫХ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ КАПУСТЫ

Следующей задачей настоящей работы явился поиск и обоснование эффективности использования антагонистов-супрессоров, перспективных для создания экологически безопасных и эффективных средств защиты капусты.

2.1. Определение конкурентоспособности выделенных штаммов *Trichoderma*

Среди представителей антагонистической микрофлоры наиболее популярными являются микромицеты из рода *Trichoderma* (Филипчук О.Д. и др., 1997; Чулкина В.А., Торопова Е.Ю., 2001). В ходе работы нами с семян, из ризосферы растений, тепличного грунта и почвы полей было выделено 42 штамма *Trichoderma*.

Разнообразие и широкая распространенность грибов рода *Trichoderma*, предполагает необходимость выяснения типов взаимоотношений между изолятами. В эксперимент был также включен штамм *Trichoderma lignorum*, используемый в тепличных хозяйствах Российской Федерации против корневой гнили овощных культур.

Как показали результаты наших экспериментов (табл. 4), наиболее часто встречающимися типами взаимоотношений между изолятами *Trichoderma* были реакции типа С (обоюдное подавление микромицетов на расстоянии) и Д (подавление конкурента при контакте и обрастание колонии подавляемого организма антагонистом). Довольно распространенным типом взаимоотношений была реакция типа В (обоюдное подавление колоний при непосредственном контакте, после чего их рост прекращался) и реакция типа В₁ (обоюдное подавление при контакте; через некоторое время антагонист продолжает расти с неизменной или меньшей скоростью поверх колонии подавляемого организма). Взаимодействие, протекающее по типу реакции Е, когда один микромицет

беспрепятственно не меняя скорости роста нарастал на другой, подавляя при этом его развитие, характерно для небольшого числа изолятов.

Таблица 4

Антагонистическая активность различных микромицетов *Trichoderma*

Виды	Штаммы грибов	Встречаемость типов реакции						ИА*	Место выделения
		A	B	B ₁	C	D	E		
<i>T. harzianum</i>	T26	1	-	2	1	-	6	37	ризосфера "Подарок" с/х "Овощевод"
	ТА	1	2	-	1	-	6	35	семена "Подарок"
	T14	-	-	2	1	-	5	32	ризосфера "Харьковская" с/х Нарманский
	T12	-	1	-	1	2	3	27	тепличный грунт с/х "Овощевод"
	T4	-	1	2	2	1	-	15	ризосфера "Амагер" с/х "Овощевод"
<i>T. viride</i>	22	-	1	-	2	3	-	19	ризосфера "Трансфер F ₁ " с/х "Нокса"
	28	-	1	-	2	1	2	21	тепличный грунт с/х "Овощевод"
	17	1	1	-	2	1	-	11	ризосфера "Амагер"
	21	-	-	-	2	1	-	10	ризосфера "Слава" с/х "Нарманский"
<i>T. koningii</i>	29	1	1	-	1	1	-	8	тепличный грунт с/х "Овощевод"
<i>T. lignorum</i>	ВКМ	-	-	1	2	2	1	18	Всероссийская станция защиты растений, Москва

ИА* - индекс антагонизма

- - отсутствие реакции

У ряда штаммов триходермы наблюдалась реакция типа А (смешанный рост двух организмов), т.е. индифферентное взаимоотношение. При этом наибольший индекс антагонизма (ИА) характерен для микромицетов, выделенных из семян и ризосферы капусты не пораженной фитопатогенами. Они превосходят по антагонистической активности и конкурентоспособности производственный штамм (*T. lignorum*), а также изоляты из тепличного грунта и ризосферы полевых растений. Таким образом, наиболее конкурентоспособными оказались штаммы *T. harzianum* (T26, ТА, T14, T12) и *T. viride* (T22, T28), которые и были использованы в дальнейшей работе.

2.2. Фитотоксичность микромицетов рода *Trichoderma*

Для многих микромицетов рода *Trichoderma* конкурентная и антагонистическая способности коррелируют с высокой фитотоксичностью (Салина О.А., 1981).

Действительно, оказалось, что, культуральная жидкость *T. viride* (штаммы T22 и T28) подавляет всхожесть семян всех исследованных сортов капусты на 35-49%. Однако для штаммов *T. harzianum* T12 и T14 обнаружен небольшой уровень фитотоксической активности (10-21%). В свою очередь, культуральная жидкость *T. harzianum* штаммов T26 и ТА не оказывая угнетающего действия на

развитие растений, стимулировала всхожесть семян различных сортов капусты на 8-21% и рост корней - на 9-19%.

Учитывая незначительную фитотоксичность *T.harzianum* T12 и T14 и полное ее отсутствие у *T.harzianum* TA и T26 указанные штаммы использовали в дальнейших экспериментах. Было установлено, что они не оказывали фитотоксического действия в отношении проростков растений (стандартный тест-объект – проростки кукурузы), а для штаммов T26 и T14 отмечено выраженное стимулирующее действие на рост тест-объектов. Наблюдаемый нами эффект стимуляции наиболее отчетливо был выражен на проростках капусты.

Итак, рекомендуемые для дальнейшей работы штаммы триходермы не токсичны по отношению к растениям и обладают некоторым стимулирующим эффектом.

2.3. Антагонистическая активность *Trichoderma* к возбудителям заболеваний сельскохозяйственных культур

В качестве тест-объектов при определении антагонистической активности *Trichoderma* были использованы как возбудители заболеваний, выделенные с семян и органов больных растений капусты, так и музейные культуры. Изучение взаимоотношений T26 и TA с фитопатогенными микромицетами, выявило их угнетающее влияние на тест-объекты, где в подавляющем большинстве случаев характер воздействия триходермы складывался по типу гиперпаразитизма (реакция E). Уровень антагонистической активности штаммов *T.harzianum* T14 и T12 был ниже, а реакция взаимоотношений с тест-объектами протекала по типу D.

Таким образом, в результате сравнительной оценки *in vitro* антагонистической активности различных штаммов *Trichoderma* установлена перспективность для борьбы с возбудителями заболеваний капусты штаммов – TA и T26, обладающих широким спектром действия по отношению к фитопатогенным микромицетам и отсутствием фитотоксичности.

ГЛАВА 3. ДЕЙСТВИЕ *TRICHODERMA HARZIANUM* НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ В УСЛОВИЯХ ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА

3.1. Изменение суммарной биомассы микроорганизмов в тепличном грунте под действием *T. harzianum* T26

Учитывая, что активной частью почвенного органического вещества и его наиболее подвижной фракцией является величина биомассы микроорганизмов (Полянская Л.М. и др. 1995; Мосина Л.В., 1996; Kussel N., 1997), исследовали влияние *T.harzianum* на содержание биомассы бактерий, мицелия и спор микромицетов в образцах тепличного грунта. Как оказалось, микробная биомасса является величиной динамичной, о чем свидетельствует колебание

этого показателя на протяжении всего срока наблюдений. Так, в тепличном грунте (контроль) величина биомассы бактерий возрастала в течение 60 суток примерно в 5 раз, мицелия грибов – в 2,5 раза, спор микромицетов – в 4 раза. После интродукции триходермы (опыт) наблюдалось достоверное увеличение биомассы бактерий, мицелия и спор микромицетов в сравнении с контролем, принятым за 100%.

3.2. Ферментативная активность тепличного грунта при внесении в нее *T. harzianum* T26

Интегральным показателем, характеризующим функциональную активность микрофлоры почвы, является ее ферментативная активность. В связи с этим, исследовали влияние *T. harzianum* на уреазную, протеазную, каталазную и целлюлозолитическую активности тепличного грунта.

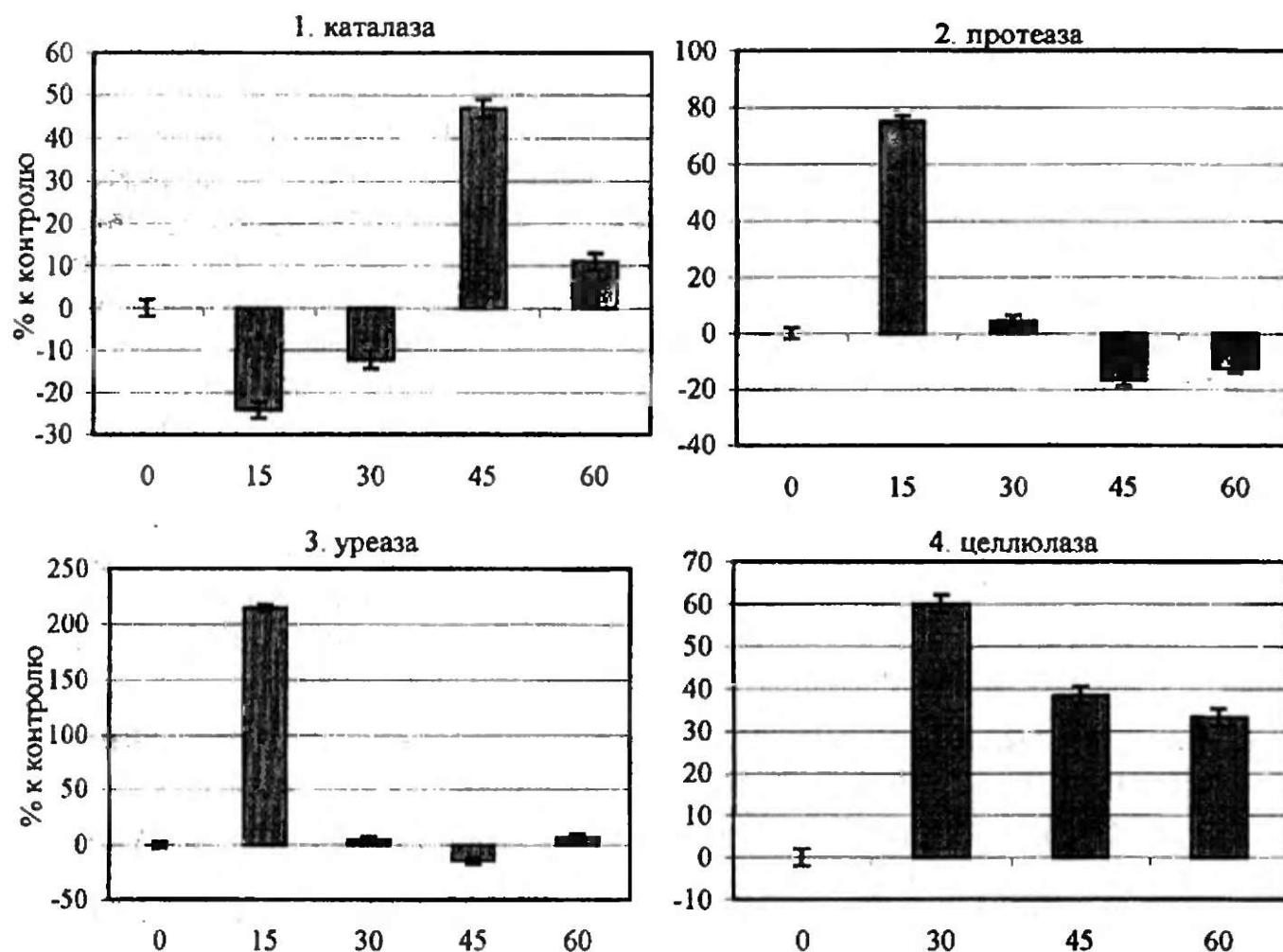


Рис. 1. Влияние *T. harzianum* T26 на биологическую активность тепличного грунта. Контроль – тепличный грунт, принятый за 100%.

Как показано на рисунке 1.1. *T.harzianum* T26, интродуцированная в тепличный грунт, не оказывает существенного влияния в течение 30 суток на активность окислительно-восстановительных ферментов (каталаза) стимулируя ее во второй период исследования. Возрастающий в течение 15 суток после внесения триходермы уровень протеолитической (рис. 1.2.) и уреазной (рис.1.3.) активностей в последующем снижается до исходного. Целлюлозолитическая активность тепличного грунта (рис. 1.4.) стимулировалась *T.harzianum* T26 на протяжении всего эксперимента.

Итак, нами установлено, что интродукция *T.harzianum* T26 оказывала положительное влияние на ферментативную активность тепличного грунта.

3.3. Влияние *T.harzianum*T26 на азотфиксирующую способность тепличного грунта

С агрономической точки зрения одним из наиболее значимых процессов, осуществляемых микроорганизмами, является процесс биологической фиксации азота, интерес к которому обусловлен его важной ролью в азотном балансе природных экосистем (Fidalgo F. et.al 1990; Ерусалимская Л.Ф. и др. 1995; Martensson A., 1994). Нами установлено, что *T. harzianum* T26 стимулирует азотфиксацию, определяемую по величине нитрогеназной активности, на 45 сутки (62 %) а на 60 сутки – ингибирует на 20 % в сравнении с контролем.

3.4. Изменение активности "дыхания" тепличного грунта под влиянием *T.harzianum* T26

Важнейшим количественным показателем темпов разложения органического вещества, интенсивности биологических процессов в почве и объективным тестом ее биологической активности является выделение CO_2 из почвы (Амирханов Д.В. и др., 1994; Звягинцев Д.В. и др. 1997). Нами было установлено, что внесение триходермы в тепличный грунт как стимулировало, так и подавляло почвенное "дыхание". Если на 15 и 60 сутки выделение CO_2 возрастало на 75 % и 22 %, то на 30 и 45 сутки исследования количество CO_2 снижалось на 11 и 21 % соответственно в сравнении с контролем.

ГЛАВА 4. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ТРИХОДЕРМЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ КАПУСТЫ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Успешная интродукция биопрепаратов зависит от сложного комплекса факторов, среди которых большую роль играют такие, как техногенность штамма, свойства носителя, технология внесения биоагентов, приживаемость интродуцентов и др.

4.1. Влияние на жизнеспособность *Trichoderma* абиотических факторов

Нами показано, что развитие штаммов триходермы ТА и T26 возможно в широком интервале температур (от 10⁰С до 35⁰С) при оптимальной скорости

роста микромицетов в диапазоне 20 - 30 °С. Существенно, что штамм Т26 является более толерантным к низким температурам (оптимальная t^0 роста 10-15 °С), чем штамм ТА (оптимальная t^0 роста 25-30 °С).

Оба штамма триходермы растут в среде со значениями рН в диапазоне от 3,5 до 8,0. Оптимум роста регистрируется при рН среды 5,5. Установленная нами способность штаммов ТА и Т26 развиваться в широком диапазоне температур и рН является одним из определяющих факторов эффективности биопрепаратов в агроэкосистеме полужакрытого типа.

4.2. Фунгистатическое действие тепличного грунта на прорастание спор *T. harzianum*

Среди факторов, оказывающих влияние на развитие интродуцентов, ведущая роль принадлежит фунгистазису, суть которого заключается в ограничении мицелиального роста и, что особенно важно, прорастания спор грибов.

Нами было установлено, что сроки формирования ростовой трубки у спор ТА и Т26 под воздействием тепличного грунта замедлялись на 1,5-2 часа в сравнении с временем прорастания их в воде. Следовательно, скорость прорастания спор этих микромицетов уменьшалась в 1,3 раза при снижении количества проросших спор лишь на 8-12%, что свидетельствует о незначительном фунгистатическом эффекте тепличного грунта по отношению к *Trichoderma*.

4.3 Изучение микрофлоры тепличного грунта и ризосферно-прикорневой зоны рассады капусты

При инокуляции почвы микробными препаратами не менее важно знание специфики состава микробного населения почвы в корневой зоне растений, которое характеризуется довольно высокой численностью микроорганизмов и широким разнообразием их функций (Кураков А.В. и др., 1994).

В тепличном грунте по нашим данным количество микроорганизмов содержалось в минимальном количестве и существенно возрастало в ризосферно-прикорневой зоне капусты. Наблюдалось изменение биоморфологической структуры грибных популяций с преобладанием мицелия в ризосфере в среднем на 23 % в зависимости от сорта капусты.

По сравнению с тепличным грунтом в ризосфере различных сортов капусты увеличивалось видовое разнообразие микромицетов (до 30 видов). Помимо этого, в ризосфере возрастало число грибов, имеющих более высокую пространственную частоту встречаемости. Таким образом, было установлено, что комплекс микромицетов тепличного грунта и ризосферы рассады капусты имеет свою специфику и отличается между собой по разнообразию видов и по их представительности.

4.4. Эффективность применения триходермина T26 и ТА для защиты капусты от различных заболеваний

Учитывая, что штаммы *T. harzianum* ТА и T26 имеют несколько отличные температурные параметры роста и не проявляют антагонистического действия по отношению друг к другу, мы использовали их последовательно на разных этапах защиты растений. Для предпосевной обработки семян применяли штамм ТА, так как температурный режим в теплицах после посева семян и до появления первых всходов является оптимальным для его роста (23-24 °С). После появления всходов, когда согласно технологии производства, температуру в теплицах понижают до температуры оптимальной для роста T26 (15-18 °С), вносили в тепличный грунт этот штамм триходермы.

В мелкоделяночных опытах использовали *T. harzianum* ТА и T26 в виде биопрепарата - триходермина, для чего в почву вносили конидии гриба, адсорбированные на шелухе ячменя с титром 10 млрд. конидий / г носителя. Были определены оптимальные нормы расхода биопрепаратов, которые составили при опудривании семян триходермином ТА - 5 г/кг, а при внесении триходермина T26 в тепличный грунт - 20 г/м². При последовательном (комплексном) внесении биопрепаратов триходермина ТА и T26 в указанных дозах было выявлено снижение заболеваемости рассады «черной ножкой», «ложной мучнистой росой», «фомозом», «фузариозом» в 1,5-3,2 раза в сравнении с контролем. Следовательно, применение триходермина положительно сказалось на всхожести семян и развитии растений в целом (табл. 6).

Таблица 6

Эффективность действия триходермы ТА и T26 при совместном использовании на распространность болезней рассады капусты

Условия опыта	Всхожесть семян (%) капусты сортов:		Распространенность болезни (%) капусты сортов:							
			"Амагер"				"Харьковская зимняя"			
	"Амагер"	Харьковс- кая зимняя"	черная ножка	фузариозное увядание	пероноспороз	фомоз	черная ножка	фузариозное увядание	пероноспороз	фомоз
Контроль 1, без обработки	79	81	39,2	21,0	18,4	13,7	44,3	14,1	14,8	15,8
Контроль 2, фундазол 6 г/кг	85	84	29,3	15,4	12,9	8,8	28,0	10,2	10,1	11,9
Последовательная обработка ТА и T26	91	89	12,1	8,2	7,3	4,1	14,2	4,9	6,2	6,5

Полученные данные были подтверждены результатами применения биопрепаратов триходермина ТА и Т26 в совхозе «Казанский Тепличный». Если обработка семян известным препаратом фундазолом повышала урожайность кочанов капусты на 6,3% по сравнению с контролем (необработанная почва), то при последовательном применении триходермина ТА и Т26 урожайность возрастала на 13,1 % относительно контроля.

Таким образом, на основании результатов исследований можно говорить о перспективности включения в систему защитных мероприятий при выращивании капусты в Республике Татарстан экологически безопасных биопрепаратов - триходермина ТА и триходермина Т26, преимущественно при их комплексном применении.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании проведенной работы нами было установлено, что выделенные из различных экологических ниш возбудители заболеваний капусты относятся к различным группам эпифитологических инфекций: почвенно-семенным, почвенно-воздушно-семенным, капельно-воздушно-семенным и воздушно-семенным. Главным фактором передачи возбудителей почвенных инфекций из года в год служат почва и инфицированные растительные остатки. Неподвижность главного фактора передачи обуславливает стабильность ареалов болезни и ее многолетнюю динамику в этих ареалах.

Изолированные нами из различных мест обитания возбудители заболеваний капусты в соответствии с данными литературы можно отнести к организмам с разными жизненными стратегиями (Дьяков, 1992). Одни из них, достигают стабильности за счет высокой скорости размножения (г-стратеги), другие – за счет повышения жизнеспособности (К-стратеги). Согласно результатам наших исследований признаками г-стратегов обладают возбудители ложной мучнистой росы, альтернариоза, фомоза, т.е. те, которые передаются воздушно-капельным путем. К-стратеги заселяют подземные вегетативные органы, а также внутренние ткани вегетативных и генеративных органов растений. К этой группе фитопатогенов относят возбудителей черной ножки рассады, ризоктониоза, белой и серой гнили, фузариоза, что согласуется с данными литературы (Чулкина В.А., 1992, 1997).

По данным Великанова Л.Л., (1994, 1997) реализация стратегии оперативного сдерживания фитопатогенов возможна при наличии активных агентов биоконтроля, среди которых часто используются микромицеты из родов *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Talaromyces* и др. Это представляется интересным, так как в микоценозах семян капусты разных сортов (Слава, Подарок, Трансфер F1) показано присутствие микромицетов родов *Trichoderma* и *Gliocladium*, являющихся антагонистами многих фитопатогенных грибов и широко используемых в качестве агентов биоконтроля возбудителей заболеваний.

Поиск штаммов микроскопических грибов против возбудителей заболеваний капусты привел к выделению из ризосферы растений, тепличного грунта, почвы полей и семян капусты 42 штаммов *Trichoderma*, отличающихся по конкурентоспособности между собой. В результате работы были отобраны два штамма *T. harzianum* T26 и ТА, не обладающие конкурентоспособностью между собой и характеризующиеся высокой антагонистической активностью по отношению к широкому спектру фитопатогенных микроорганизмов и особенно - возбудителям заболеваний капусты (*Alternaria brassicae* и *A. Alternata*).

Испытания биопрепаратов триходермина, приготовленных на основе штаммов ТА и T26, показали, что, их совместное использование по схеме, включающей наиболее оптимальные условия роста *Trichoderma* и нормы расхода препаратов в агроэкосистеме полужакрытого типа положительно сказывается на биологической активности и плодородии почвогрунта.

Результаты двухлетних экспериментов по практическому использованию триходермина в полевых условиях показало, что совместное применение его повышало урожайность на 13,1 % относительно контроля. При этом содержание сухих веществ, сахара и витамина С как в контрольном так и в опытных вариантах капусты было одинаковым.

Полученные результаты позволяют рекомендовать биопрепараты на основе штаммов *T. harzianum* ТА и T26 в качестве средства защиты капусты как в условиях естественного роста, так и - защищенного грунта.

ВЫВОДЫ

1. Анализ фитосанитарного состояния семян капусты выявил их пораженность возбудителями трахеомикозного увядания, черной пятнистости, фомоза, серой и белой гнилей, бактериозом и плесневыми грибами. Поражение капусты возбудителями заболеваний наблюдается практически на всех этапах ее выращивания (рассаде, растущих в полях растениях), что свидетельствует о неблагоприятном фитосанитарном состоянии посевного материала и почв в Республике Татарстан и диктует необходимость разработки эффективных средств защиты семенного фонда и посадочного материала.

2. Среди широкого ряда микромицетов рода *Trichoderma* (42 штамма), выделенных из семян, ризосферно-прикорневой зоны капусты и тепличного грунта дифференцированы штаммы *T. harzianum* ТА и T26, которые благодаря своей высокой конкурентоспособности, повышенной антагонистической активности к широкому ряду возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур, отсутствию фитотоксичности были признаны наиболее перспективными в качестве средств биозащиты капусты.

3. Оценка экологических последствий применения штаммов *T. harzianum* ТА и T26 в агроэкосистеме полужакрытого типа показала повышение активности почвенных ферментов (уреазы, протеазы, каталазы и целлюлазы), уровня

нитрогеназной активности без существенных изменений "дыхания" почвы, что свидетельствует о положительном влиянии триходермина на биологическую активность и плодородие почвогрунта.

4. На основе штаммов *Trichoderma harzianum* ТА и Т26 получены биопрепараты (триходермин), для борьбы с возбудителями заболеваний капусты. Максимальная эффективность их интродукции строго зависит от дозы, которая для ТА составляет 5 г/кг семян, для Т26 – 20 г/м² тепличного грунта.

5. Последовательное использование триходермина ТА и Т26 для обработки семян капусты и тепличного грунта перед посадкой рассады снижает заболеваемость растений в 1,5-3,2 раза и способствует повышению урожайности в полевых условиях на 13,1 %. Выявленный эффект позволяет рекомендовать триходермин в качестве средства защиты капусты.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Алимова Ф.К., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю., Илларионова И.А. Оптимизация интродукции экологически безопасного биопестицида триходермина в почву на фоне антропогенного воздействия. // Конф. «Интродукция микроорганизмов в окружающую среду», [Москва], 17-19 мая, 1994: Тез. докл. - М., 1994. - С. 8-9.

2. Egorov S.Yu., Alimova F.K., Zakharova N.G., Leshinskaya I.B., Fattakhova A.N., Ilarionova I.A. Introduction and kinetics of micromycete *Trichoderma harzianum* in greenhouse soil / Forum for applied biotechnology. Brugge, Belgium, 1995. Abstract Book. - V.1. - P. 55-59.

3. Илларионова И.А., Захарова Н.Г., Алимова Ф.К. Численность и структура микромицетных комплексов ризосферно-прикорневой зоны рассады различных сортов капусты. // Проблемы общей биологии и прикладной биологии. Сборник трудов молодых ученых. Вып. 1. Изд-во Саратовского ун-та. - 1997г. - С. 94-100.

4. Илларионова И.А. Некоторые аспекты экологии микромицета рода *Trichoderma* // Конф. Актуальные вопросы мониторинга экосистем антропогенно-нарушенных территорий. [Ульяновск], 13-15 дек., 2000: Тез. докл., - Ульяновск., - 2000. - С. 97-98.

5. Илларионова И.А., Захарова Н.Г. / Биологическое обоснование защиты капусты от фитопатогенных микроорганизмов в Татарстане. // " Ферменты микроорганизмов, XII Юбилейная конференция", Тез. докл., - Казань, 5-9 февраля, 2001 г. - С. 71-72.

6. Илларионова И.А., Захарова Н.Г., Алимова Ф.К., Егоров С.Ю. Оценка риска применения триходермина в управляемых агроэкосистемах // Международная научно-практическая конференция «Почва, жизнь, благосостояние», Пенза, 19-20 июня 2001 г. - С. 57-59.

7. Егоров С.Ю., Захарова Н.Г., Илларионова И.А. Жизнедеятельность и симбиотические свойства клубеньковых бактерий Учебно-методическая разработка. КГУ. Казань, 2002.

8. Илларионова И.А., Захарова Н.Г., Алимова Ф.К., Егоров С.Ю. Фитосанитарное состояние семенного фонда и посевов белокочанной капусты Республики Татарстан // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук - 2002. - №1. - С. 73-76.

9. Захарова Н.Г., Илларионова И.А., Алимова Ф.К., Егоров С.Ю. Скрининг штаммов *Trichoderma*, активных против возбудителей заболеваний капусты // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук - 2002. - № 3. - С. 38-40.

Отпечатано в ООО «СИДДХИ-СЕКЬЮРИТИ».

Казань, ул. Журналистов, 1/16. Лицензия №0130 от 1.07.98 г. Заказ № 521.

Подписано в печать 14.11.02. Печ. л. - 1,25. Формат 60х90 1/16. Тираж 100 экз.

Бумага офсетная. Печать - ризография